

2009 年度修士論文要旨

## ビスフェノール A によるプロテインジスルフィドイソメラーゼ

### の活性阻害の機構解明

関西学院大学大学院理工学研究科

化学専攻 山口研究室 芝野 智久

ビスフェノール A(BPA)は生物の生殖機能を乱すホルモン様作用を示すことが知られその作用について多くの研究が行われている。さらに、近年 BPA が脳や中枢神経系の機能へ影響するということが報告された。この原因の解明を目的として、共同研究者の今岡らによって、BPA アフィニティーカラムを用いて、ラット脳内における BPA の標的タンパク質が探索された。その結果、ラット脳より抽出された BPA 結合タンパク質のアミノ酸分析により、それがプロテインジスルフィドイソメラーゼ(PDI)であると同定された。PDI は小胞体内に存在する 56 kDa のタンパク質であり、ミスフォールドタンパク質や新生タンパク質のジスルフィド結合の形成、還元、異性化を担うことが知られており、N 末端側から a, b, b', a', c ドメイン領域により構成されている。PDI はこのようなジスルフィドイソメラーゼ活性以外にも様々な機能を持つ多機能タンパク質であり、ジスルフィド結合を持たないタンパク質に対してもフォールディングを促進させるシャペロン機能を持つことや、プロリン水酸化酵素の  $\beta$  サブユニットとしての機能を有し  $\alpha$  サブユニットの構造を安定化させる機能などが明らかになっている。さらに、BPA が PDI のイソメラーゼ活性を阻害するということが報告されている。ドメイン単位での表面プラズモン共鳴法を用いた解析結果から、PDI の BPA 結合ドメインは a' と b' ドメインであることが明らかになった。また、ドメイン単位のイソメラーゼ活性測定によって、BPA が b' ドメインに結合することで、イソメラーゼ活性阻害が引き起こされることが明らかにされた。つまり、BPA が PDI の活性中心に直接的に相互作用することで、イソメラーゼ活性阻害するのでは無く、他のアミノ酸残基に特異的に結合することにより、基質の結合阻害や PDI の構造変化などを引き起こしてイソメラーゼ活性を阻害していると考えられた。しかしながら、BPA が PDI の立体構造に与える影響についての知見は得られていない。そこで、構造学的な見地から BPA がどのようにして PDI のイソメラーゼ活性阻害を引き起こすのかを明らかにするために、円偏光二色性分光法、質量分析法、示差走査熱量計法、動的光散乱法や X 線回折法を用いての多角的な解析に着手した。

PDI を大腸菌発現系を用いて大量発現させ、各種クロマトグラフィーによる精製を行い、SDS-PAGE により単一のバンドを示す試料を得た。まず、BPA やその類縁体を添加した時の PDI の二次・三次構造変化を調べるために円偏光二色性測定を行なった。その結果、二次構造の変化は観測されなかったが、近紫外部のスペクトル変化から PDI の芳香族側鎖周辺の微細な構造に変化が起きていることがわかった。これにより、BPA のイソメラーゼ活性阻害は PDI の立体構造の変化に起因するということが考えられた。次に、BPA が PDI の立体構造の安定性に与える影響を評価するために示差走査熱量計による熱解析を行なった。その結果、BPA を添加することにより、構造安定性の指標である  $T_m$  値が上昇し、PDI の立体構造が安定化したと考えられた。このことより、BPA によるイソメラーゼ活性阻害は PDI の構造の不安定化によって引き起こされるものではなく、BPA が PDI に結合することで PDI のフレキシブルな構造をリジッドにすることにより引き起こされることが示唆された。

次に、この構造の安定化によるイソメラーゼ活性阻害の機構の解明とドメイン単位で BPA が PDI の構造にどのような影響を与えているのかを明らかにするために、bb'ドメインと a'cドメインの円偏光二色性測定と質量分析を行った。円偏光二色性測定の結果、a'c ドメインにおけるスペクトル変化は観測されず、二次・三次構造変化は起きないことがわかった。一方、bb'ドメインでは近紫外部では濃度依存的に大きなスペクトル変化が生じた。これより、BPA は bb'ドメイン内の芳香族鎖周辺で微細な構造変化を引き起こすことがわかった。次に、MALDI-TOF/MS を用いて、bb'ドメインと a'c ドメインの質量分析を行った。その結果、ドメイン領域に対応するピークは検出できたが、BPA を添加することによる質量増加を検出することはできなかった。これは TOF/MS におけるレーザー照射によって、PDI と BPA 間の相互作用が切り離されたことを示し、つまり BPA の PDI 各ドメインに対する相互作用が共有結合といった強い相互作用でないことを明らかにした。

さらに、BPA による PDI のイソメラーゼ活性阻害の作用機構を原子レベルで理解するために、PDI, bb'ドメインと a'c ドメインの X 線結晶解析に向けた精製・結晶化を試みた。その結果、bb'ドメイン単体と及び bb'ドメインと BPA の複合体について単結晶を得ることに成功した。そして、X 線源にシンクロトロン放射光(SPring-8, BL44XU)を用い、これらの結晶について X 線回折実験を行った。その結果、得られた回折点から、結晶はタンパク質のものであると考えられたが、分解能が低く、解析には適さない事が明らかになった。今後、高分解能の回折を与える結晶を得るために、今回、結晶が析出した条件を中心として、pH や沈殿剤濃度などを変化させて結晶化条件の精密化を行う必要がある。